

First Hit

L3: Entry 1 of 2

File: JPAB

Oct 28, 1982

PUB-NO: JP357175127A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 57175127 A
TITLE: SUBSTANCE AND VACCINE RELATED TO HEPATITIS NANB-1 AND NANB-2 VIRAL ANTIGEN

PUBN-DATE: October 28, 1982

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
YOSHIZAWA, KOJI	
MAYUMI, TADASHI	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
NAKAMURA TETSUO	

APPL-NO: JP56060221
APPL-DATE: April 21, 1981

US-CL-CURRENT: 424/228.1
INT-CL (IPC): A61K 39/29

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain the titled vaccine, having a high immunogenicity without infection, and useful for a detecting reagent of the titled viral antigen, by treating hepatitis NANB-1 and NANB-2 viral particles with an organic solvent, and heat-treating the particles.

CONSTITUTION: Viral particles, obtained from the blood serum of the hepatitis NANB-1 in the acute stadium, and found to be capable of agglutinating with the hepatitis NANB-1 blood serum in the decubation and infecting and developing the typical hepatitis NANB-1 in sensitive animals are inactivated by the addition of an organic solvent, e.g. 37% formalin, and the heat-treatment (60°C for 10hr) to give a hepatitis NANB-1 viral vaccine. Similarly, the hepatitis NANB-2 viral vaccine is obtained. The resultant respective specific antibodies of the hepatitic viruses permit the detection of the new hepatitis NANB-1 and NANB-2 viral antigens capable of infecting and developing the hepatitis non-A and non-B.

COPYRIGHT: (C)1982,JPO&Japio

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—175127

⑤ Int. Cl.³
A 61 K 39/29

識別記号

庁内整理番号
6408—4C

⑬ 公開 昭和57年(1982)10月28日

発明の数 5
審査請求 未請求

(全 11 頁)

④ NANB—1 型及び NANB—2 型の肝炎ウイルス抗原関連物質及びワクチン

東京都板橋区高島平7丁目49番11号

② 特 願 昭56—60221

⑦ 発 明 者 真弓忠

② 出 願 昭56(1981)4月21日

東京都渋谷区神宮前4丁目13番2号

特許法第30条第1項適用 昭和55年10月22日
発行日本肝臓学会「肝臓」第21巻第9号に発表

⑧ 出 願 人 中村徹雄

東京都新宿区高田馬場1丁目1番15号の407

⑦ 発 明 者 吉澤浩司

⑨ 代 理 人 弁理士 山崎行造 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

NANB—1 型及び NANB—2 型の肝炎ウイルス抗原関連物質及びワクチン

2. 特許請求の範囲

(1) NANB—1 型肝炎急性期の血清から得られ、NANB—1 型肝炎回復期血清と抗原抗体反応を生じることとを特徴とする NANB—1 型肝炎ウイルス関連物質。

(2) NANB—2 型肝炎急性期の血清から得られ、NANB—2 型肝炎回復期血清と抗原抗体反応を生じることとを特徴とする NANB—2 型肝炎ウイルス関連物質。

(3) NANB—1 型肝炎急性期の血清中に見出され、NANB—1 型肝炎回復期血清と凝集し、かつ感受性動物に定型的な NANB—1 型肝炎を感染発

症させることが明らかになっているウイルス粒子を、有機溶媒処理及び加熱処理して不活化してえられる NANB—1 型肝炎ウイルスワクチン。

(4) NANB—2 型肝炎急性期の血清中に見出され、NANB—2 型肝炎回復期血清と凝集し、かつ感受性動物に定型的な NANB—2 型肝炎を感染発症させることが明らかになっているウイルス粒子を、有機溶媒処理及び加熱処理して不活化してえられる NANB—2 型肝炎ウイルスワクチン。

(5) NANB—1 型肝炎ウイルス、NANB—2 型肝炎ウイルスの熱処理による消毒法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は非 A 非 B 型肝炎ウイルス及びその不活化ワクチン、即ち、NANB—1 型肝炎ウイルス及びその不活化ワクチン、NANB—2 型肝炎ウイルス及びその不活化ワクチンに関する。更に詳しくは高い免疫原性を有し、しかも感染性をなく

するのに十分なホルマリン及び加熱不活化処理を行つたNANB-1型及びNANB-2型肝炎ウイルスワクチンに関する。

1965年ブランベグらによるオーストラリア抗原(HB θ 抗原)の発見[Blumberg B. S et al. ジャーナル・オブ・アメリカン・メデイカル・アソシエーション(J. Am. Med. Ass.)第191巻第541頁(1965年)]が契機となつて、それ以来B型肝炎に関する知見は長足に進歩した。一方、ファインストンらが潜伏期の短い肝炎患者の糞便中にA型肝炎ウイルスを電子顕微鏡下にとらえた[Feinstone S. M. et al. サイエンス(Science)第182巻第1026頁(1973年)]。

これらの研究の結果、A型、B型のウイルス肝炎の予防は実用的になり、輸血によるB型肝炎の発生は、そのスクリーニング法の確立により激減した。

これらの報告によると、感染因子には特異な管状構造物を形成するF-株と核内に球状粒子を形成するH-株があるとされている。F-株は慢性の非A非B型肝炎患者の血清を接種材料として得たものであり、H-株は急性の非A非B型肝炎患者の血清を接種材料として得たものである。しかしながら、細胞内管状構造物及び核内粒子集合物の出現と非A非B型肝炎ウイルス自体との関連はまだ不明であり、その特異性についても免疫電子顕微鏡のような方法で明らかにされておらず、これらのウイルスに対する特異抗体は得られていない。これは後にF-株にH-株が混存していたためであることがわかつた。

本発明者らは、このような非A非B型肝炎に対する鋭意なる研究の結果、B型肝炎ウイルス関連抗原抗体陰性の供血者血漿及び血清から感受性動物(例えばチンパンジーのようなもの)に定型的な

しかしながら、これらのスクリーニングによるチエツクにもかかわらず約10%の受血者に輸血後肝炎が発症している。これらはA型、B型肝炎ウイルスとは免疫血清学的に異なるものであり、非A非B型肝炎といわれている。これら非A非B型肝炎について、アルターら[Alter H. J. et al, ザ・ランセット(The Lancet)第1巻第459頁(1978年)]、及び、ターバーら[Tabor, E. et al, ザ・ランセット第1巻第463頁(1978年)]が、急性または慢性の非A非B型肝炎供血者血清をもちいたチンパンジー感染実験に成功し、感染因子(ウイルス)による肝炎であることを確定した。又、清水ら[Shimizu Y. K et al, サイエンス、第205巻第197頁(1979年)]はチンパンジーのトランスアミナーゼ上昇期を中心に電子顕微鏡下に肝細胞質内に二重膜構造の特異な管状構造物を認めている。

非A非B型肝炎を感染発症させる新しいウイルス抗原、すなわち、NANB-1型肝炎ウイルス及びNANB-2型肝炎ウイルスの分離、同定に成功した。本発明者らはさらに、NANB-1型及びNANB-2型のウイルスに有機溶媒を添加して一定時間加熱処理することにより、不活化することができるとを発見し、これに基づきこれらのウイルスのワクチンを得た。

NANB-1型及びNANB-2型のウイルスの分離、同定は以下の通りなされている。まず非A非B型肝炎を起こすという臨床的事実が確認されている生体材料(ヒト血漿分画製剤、供血者血清、肝組織、尿等)を感受性動物に接種する。接種後の感染動物の血清グルタミック・ピルビック・トランスアミナーゼ(S-GPT)値の変動を観察し、肝炎の発症を確認する。回復後の感受性動物の血清に接種したのと同じ生体材料を用い、免疫電

子顕微鏡法により、抗原抗体反応による凝集塊を観察する。また超薄切片法により観察すると、発症後一定期間の肝細胞質内に特異な管状構造物が認められる場合と、かかる管状構造物が肝細胞質内に認められず、また細胞核内にも球状粒子が認められない場合とがあることがわかる。これにより2種類の抗原が存在することがわかる。

特異な管状構造物を形成する抗原を接種した後回復した感受性動物に再度同一の抗原を接種しても、再発症は認められない。これは他方の抗原についても同様である。この事実により、各々の抗原に対する抗体の形成が証明される。

次に、各々の感受性動物に既に接種したのと異なる抗原を接種すると逆感染が認められる。これにより2つの抗原はそれぞれに特異的な抗体を産生することがわかる。そこで、特異な管状構造物を形成するウイルスをNANB-1型肝炎ウイルス

と命名し、他方をNANB-2型肝炎ウイルスと命名する。

これらのNANB-1型及びNANB-2型の肝炎ウイルスは急性肝炎及び慢性肝炎のいずれをも起こしうる。従つて、肝炎が慢性であるか急性であるかによりウイルスをF-株及びH-株に分類する従来の方式は正確ではないと言ふことができる。

NANB-1型及びNANB-2型の肝炎ウイルスのワクチンは、免疫原性を維持したまま感染性を失活させるように一定時間加熱処理を施すことにより得られる。また有機溶媒処理によつて加熱処理の条件を緩和することができる。この条件は加熱時間、加熱温度、有機溶媒の有無及びその濃度等により種々変化する。有機溶媒としてはホルマリンが望ましい。

本発明によりNANB-1型及びNANB-2型

の肝炎ウイルスのそれぞれの特異抗体を得たことにより、これをヒト血清中のNANB-1型及びNANB-2型肝炎ウイルス抗原を検出するアッセイ試薬に利用することができるようになった。

本発明の実施例を以下に示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

例1 NANB-1型及びNANB-2型のウイルスの分離及び同定

非A非B型肝炎をおこすという臨床的事実が確認されているヒト血漿分画製剤をチンパンジーに3代継代感染させた。即ち、このヒト血漿分画製剤10mlを静脈内接種して経過を観察した。第1代感染動物の接種後5週からS-GPT値(血清グルタミクピルビツクトランスアミナーゼ値)のピーク(11週)までの期間のブール血清2mlを第2代感染動物に静脈内接種し、経過を観察した。更に接種後4週からS-GPT値が上昇しはじめ

る時期(7週)までのブール血清2mlを第3代感染動物に静脈内接種し経過を観察した。

上記の経過観察結果は、第1代は接種後11週で、第2代は接種後8週で、第3代は接種後5週で、S-GPT値はピークに達し、その後それぞれのチンパンジーは経過よく、S-GPT値は正常範囲に復した。又、それぞれの感染動物の肝生検組織を材料とし、電子顕微鏡下で超薄切片法により肝細胞の変化を観察した結果、第2代の場合、第1代のブール血清接種後4週から11週までの間に限つて、肝細胞内に特異的な管状構造物を見出した。これは、肝炎発症に少し先だつて出現し、肝炎回復と共に消失する。さらに、免疫電子顕微鏡法により、非A非B型肝炎ウイルス抗原粒子の検出を行つた。以下その詳細を記す。即ち、サンプル30mlを、0.1MのNaCl、0.005MのEDTA及び0.05% (wt/vol)のプロナーゼEを含む40

mlのトリス塩酸バッファー(0.01M, pH 7.2)に加え、ベツクマン社製SW 27ロータを用い、10,000 rpmで20分ゴミとり遠心をし、その後、26,000 rpmで20時間遠心した。得られた沈殿物を上記と同一組成のバッファーに懸濁して1 mlとし、SW 65ロータを用い10,000 rpmで20分ゴミとり遠心をした後、下から順に64% (wt/wt)の蔗糖0.5 ml、30% (wt/wt)の蔗糖1.0 ml及び20% (wt/wt)の蔗糖2.5 mlを入れた中に静かに注入し、このサンプル1 mlの蔗糖密度勾配遠心を64,000 rpmで3.5時間行い、0.4 mlづつのフラクションを得た。これらの精製されたサンプル100 μ lを、0.1MのNaCl、0.005MのEDTA及び0.5%のBSAを含むトリス塩酸バッファー(0.01M, pH 7.2)800 μ lに混ぜ、各混合液に100 μ lのスタンダード抗体を含む血清を加えた。次いで、混合液を37℃、1時間イン

のものであることを確認した。これはNANB-1型肝炎ウイルス粒子である。

次に、NANB-2型肝炎ウイルスの分離、同定は以下に行つた。ヒト非A非B型肝炎回復後のチンパンジーの血清をスタンダード抗体として、免疫電子顕微鏡法によりウイルス粒子が検出されたB型肝炎ウイルス関連抗原抗体陰性の供血者血漿を接種材料としてチンパンジーに接種した。接種後4.5～5週目にS-GPT値の上昇がみられ、肝炎急性期の血清中には接種材料と同一の抗原性を有する直径20～27nmの球状ウイルスが免疫電子顕微鏡法により検出された。しかし、チンパンジーの肝細胞質内には特異な管状構造物はみられず、また肝細胞核内にもウイルス様粒子等は証明できなかった。この事により、供血者血漿中に含まれているウイルス株は肝細胞質内に特異な管状構造物を形成するNANB-1型肝炎ウイル

スにキュベートした後、ベツクマンType 40ロータで23,000 rpmで90分間遠心した。その沈殿物を25 μ lの蒸留水に懸濁し、2%リンタングステン酸(pH 6.7)で染色し、400メツシュのカーボンコート銅グリッドを使用し、電子顕微鏡で1グリッド当たり20～40視野を80Kv \times 50,000の倍率で検鏡した。スタンダード抗体は非A非B型肝炎回復後37週目のチンパンジーの血清を使用した。

この方法により、ウイルス粒子が検出された血清(B型肝炎ウイルス関連抗原抗体陰性)を接種材料としてチンパンジーに接種した。接種後5.5～6週でS-GPT値の上昇がみられ、免疫電子顕微鏡法により直径20～27nm前後の球形ウイルスが検出された。また超薄切片法によると肝細胞質内には特異な管状構造物がみられ、ヒト血漿分画製剤を接種材料とした非A非B型肝炎と同型

ス株とは異なるもう一つのタイプの非A非B型肝炎ウイルス株と考えられる。

次に、この肝炎ウイルスがNANB-1型肝炎ウイルスと免疫学的に異なる別のウイルスであることを再感染実験、及び逆感染実験をおこなうことにより証明した。即ち、免疫電子顕微鏡法により検出されたNANB-2型肝炎ウイルスを含む供血者血漿の接種によりNANB-2型肝炎を感染させ、その終了後11週を経た2頭のチンパンジーに、同一の感染材料を各5 ml静脈内接種し、12週経過を観察したが、S-GPT値の変動はみられず、また肝組織像の変化も認められなかつた。この事により、肝炎経過後のチンパンジーが、このウイルスに対する感染防御能力を獲得していることが立証された。さらに、この感染防御能力を獲得している2頭のチンパンジーに、肝細胞質内に特異な管状構造物をつくる感染源、即ちNANB-1型

肝炎ウイルス抗原を各1 ml 静脈内接種した。その結果接種後2～4.5週目でS-GPT値の一過性の上昇がみられ、感染したチンパンジーの肝細胞質内にはNANB-1型肝炎ウイルス抗原によるNANB-1型肝炎感染にともなつてNANB-2型肝炎感染時にはみられなかつた特異な管状構造物が超微形態的に認められ、これはS-GPT値の正常化にともなつて消滅した。

次に、NANB-1型肝炎感染終了後、さらにNANB-1型肝炎ウイルス抗原を感染させ生化学的、超微形態的にNANB-1型肝炎ウイルスに対する感染防御能力を獲得したことを確認したチンパンジーに、NANB-2型肝炎ウイルス抗原を1 ml 静脈内接種した。接種後S-GPT値は8週目にピークに達し、その後正常域に復したが、NANB-1型肝炎ウイルス抗原接種1回目にみられた肝細胞質内の特異的な管状構造物は、NANB-2型

形態学的、及び超微形態学的にもNANB-1型肝炎の感染発症はみられなかつた。

すなわち、前記期間中S-GPT値の顕著な変化は見られず、肝細胞内に特異な管状構造物も認められず、さらにNANB-1型肝炎の回復期血清との凝集塊も免疫電子顕微鏡下で認められなかつた。これによりこのワクチンのNANB-1型肝炎ウイルスの感染性がないことがわかる。また、接種後23週目の血清に不活化前のNANB-1型肝炎ウイルス陽性血清を加えて免疫電子顕微鏡で観察したところ、凝集塊が確認された。これにより、このワクチンの免疫原性が確認される。

同様にNANB-2型肝炎回復後の血清と凝集することが免疫電子顕微鏡法によつて確認されている高度に精製したNANB-2型肝炎ウイルス陽性血清に、37%ホルマリン(和光純薬㈱)を1:2,000の割合で加えて、60℃で10時間加熱

肝炎ウイルス抗原接種後、全経過を通じて認められなかつた。又、血清中のB型肝炎ウイルス関連抗原抗体は全経過を通じて陰性であつた。以上のことから2種の非A非B型肝炎ウイルス株は、免疫学的に異なり、さらに超微形態学的にも異なつたタイプの肝炎をおこす、NANB-1型、NANB-2型の肝炎ウイルスであることを実証した。これを第1図及び第2図に示す。

例2 NANB-1型及びNANB-2型の肝炎ワクチン

NANB-1型肝炎回復後の血清と凝集することが免疫電子顕微鏡法によつて確認されている高度に精製したNANB-1型肝炎ウイルス陽性血清に、37%ホルマリン(和光純薬㈱)を1:2,000の割合で加えて、60℃で10時間加熱処理した。これを2頭のチンパンジーに各々1 mlずつ静脈内接種した。23週間の経過観察期間中、生化学的、

処理した。これをチンパンジーに各々1 mlずつ静脈内接種した。同様に23週間の経過観察期間中、生化学的、形態学的、及び超微形態学的にもNANB-2型肝炎の感染発生はみられなかつた。

すなわち、NANB-1型肝炎ウイルスのワクチンと同様にS-GPT値の顕著な変化が見られず、NANB-2型肝炎の回復期血清との凝集塊も免疫電子顕微鏡下で認められなかつた。これによりこのワクチンのNANB-2型肝炎ウイルスの感染性がないことがわかる。また、接種後23週目の血清に不活化前のNANB-2型肝炎ウイルス陽性血清を加えて免疫電子顕微鏡で観察したところ、凝集塊が確認された。これにより、このワクチンの免疫原性が確認される。これを下記の第1表及び第3図乃至第6図に示す。

第1表

ホルマリン 1:2000、60℃、10時間不活化ワクチン 1 ml
をチンパンジー静脈内接種した場合の S-GPT 値

	NANB-1		NANB-2	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
-1	15	14	11	22
-0.5	18	14	14	32
0	13	12	21	18
0.5	21	15	—	21
1	9	11	13	15
1.5	32	15	10	11
2	20	13	12	13
2.5	25	19	8	8
3	19	27	11	11
3.5	18	16	17	15
4	16	12	11	14
4.5	18	16	14	15
5	25	22	12	17
5.5	18	6	16	18
6	21	21	15	11
6.5	14	21	13	14
7	20	16	15	12
7.5	22	18	12	13
8	25	24	13	6
8.5	23	20	—	—

表 1 続き

特開昭57-175127 (6)

	NANB-1		NANB-2	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
9	16	23	19	14
9.5	23	22	—	—
10	32	20	18	11
10.5	21	19	—	—
11	20	19	13	10
11.5	22	23	—	—
12	13	15	10	10
12.5	19	6	—	—
13	16	15	14	14
13.5	18	15	—	—
14	20	16	11	11
14.5	—	—	—	—
15	19	14	12	11
15.5	46	19	—	—
16	30	21	12	12
16.5	20	16	—	—
17	20	14	13	15
17.5	19	23	—	—
18	16	16	8	10
18.5	19	19	—	—

表 1 続き

	NANB-1		NANB-2	
	No. 1	No. 2	No. 1	No. 2
19	15	17	14	12
19.5	17	16	—	—
20	18	16	11	9
20.5	19	19	—	—
21	16	15	11	18
21.5	17	16	—	—
22	17	23	11	12

以上により、上記の不活化処理により、免疫原性を維持したままの NANB-1 型及び NANB-2 型肝炎ウイルスの感染性の失活が実証され、NANB-1 型肝炎ウイルス及び NANB-2 型肝炎ウイルスのワクチンが開発できた。

さらに、100℃の温浴で5分間熱処理した NANB-1 型及び NANB-2 型肝炎ウイルスをチンパンジーに各 1 ml 静脈内接種したところ前記と同様に生化学的、形態学的、超微形態学的にも、NANB-1 型及び NANB-2 型肝炎の感染発症はみられず、上記ウイルスの失活が証明され、加熱による消毒が実証できた。これを下記の第 2 表及び第 7 図及び第 8 図に示す。

第2表

100℃、5分熱処理不活化ワクチンを1ml
 静脈内接種した場合のS-GPT値

週	NANB-1	NANB-2
-1	16	23
-0.5	12	16
0	15	21
0.5	14	23
1	35	31
1.5	19	20
2	16	24
2.5	20	20
3	15	26
3.5	11	26
4	16	14
4.5	17	29
5	19	20
5.5	15	12
6	18	19

特開昭57-175127(7)

4. 図面の簡単な説明

第1図はチンパンジーのNANB-2型肝炎ウイルス及びNANB-1型肝炎ウイルスの再感染試験を示すグラフであり、横軸は最初の接種からの経過時間(週)を示し、縦軸はS-GPT値を示し、図中の口は肝細胞中の特異な管状構造物の有無(■はそれが認められる場合、□はそれが認められない場合)を示す。

第2図はチンパンジーのNANB-1型肝炎ウイルス及びNANB-2型肝炎ウイルスの逆感染試験を示すグラフであり、横軸、縦軸及び図中の口は第1図と同様である。

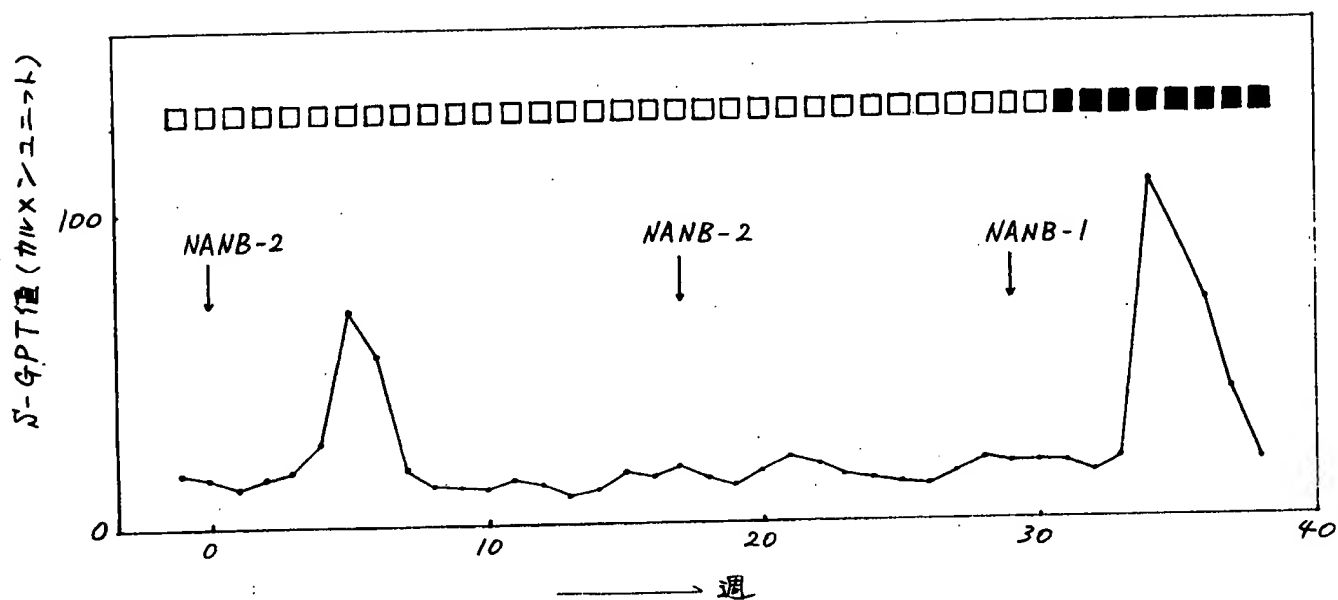
第3図及び第4図はホルマリン1:2,000、60℃、10時間で不活化したNANB-1型ワクチン1mlをチンパンジーに静脈内接種した場合のS-GPT値の変化を示すグラフであり、第3図は第1表のNANB-1のNo.1に相当し、第4図はNo.

2に相当する。

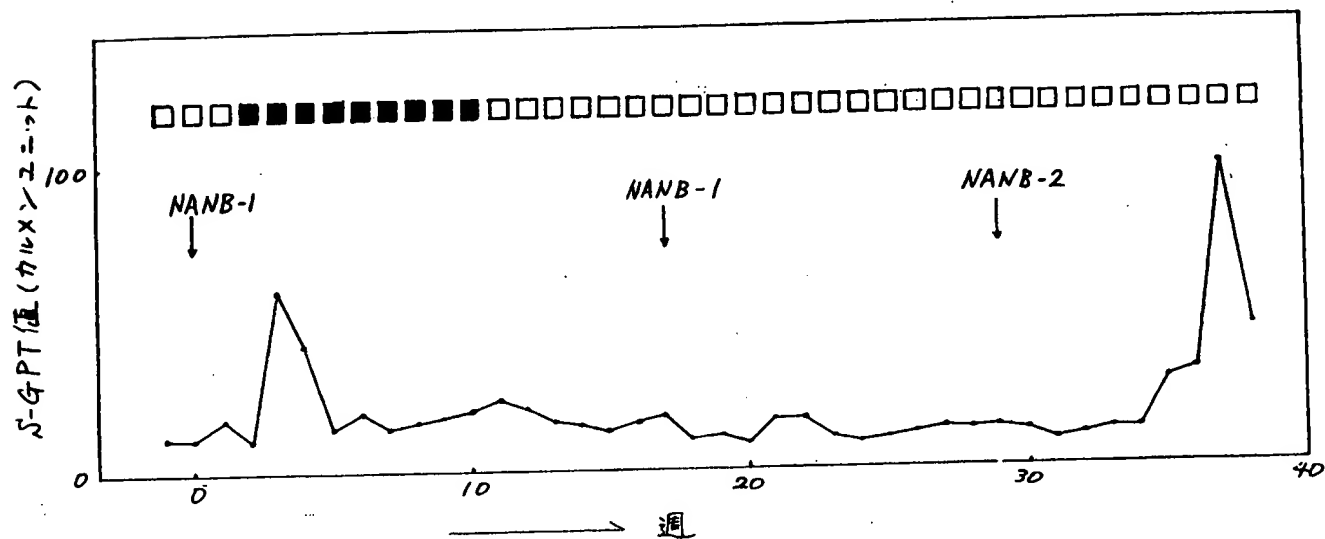
第5図及び第6図はホルマリン1:2,000、60℃、10時間で不活化したNANB-2型ワクチン1mlをチンパンジーに静脈内接種した場合のS-GPT値の変化を示すグラフであり、第5図は第1表のNANB-2のNo.1に相当し、第6図はNo.2に相当する。

第7図及び第8図は100℃で5分間熱処理して不活化したNANB-1型及びNANB-2型肝炎ウイルスのワクチン1mlをチンパンジーに静脈内接種した場合のS-GPT値の変化を示すグラフである(第7図はNANB-1、第8図はNANB-2)。

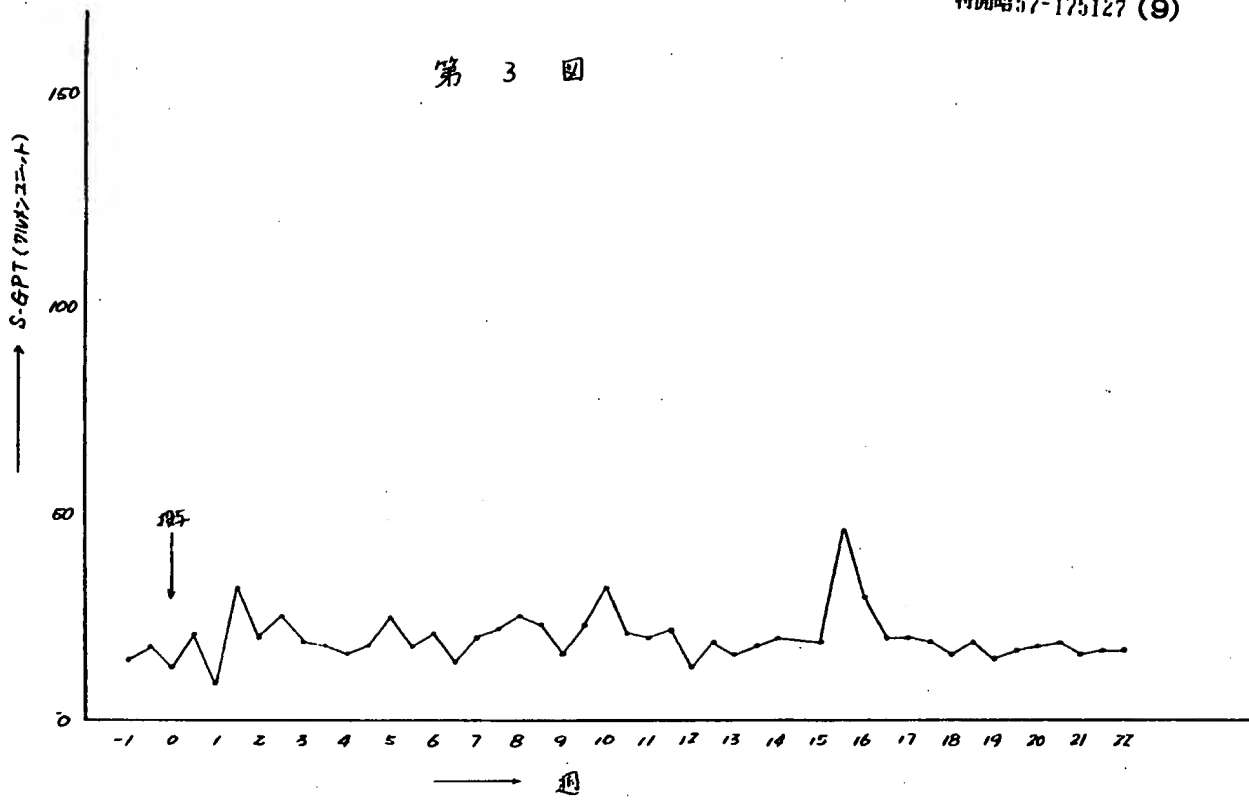
第 1 図



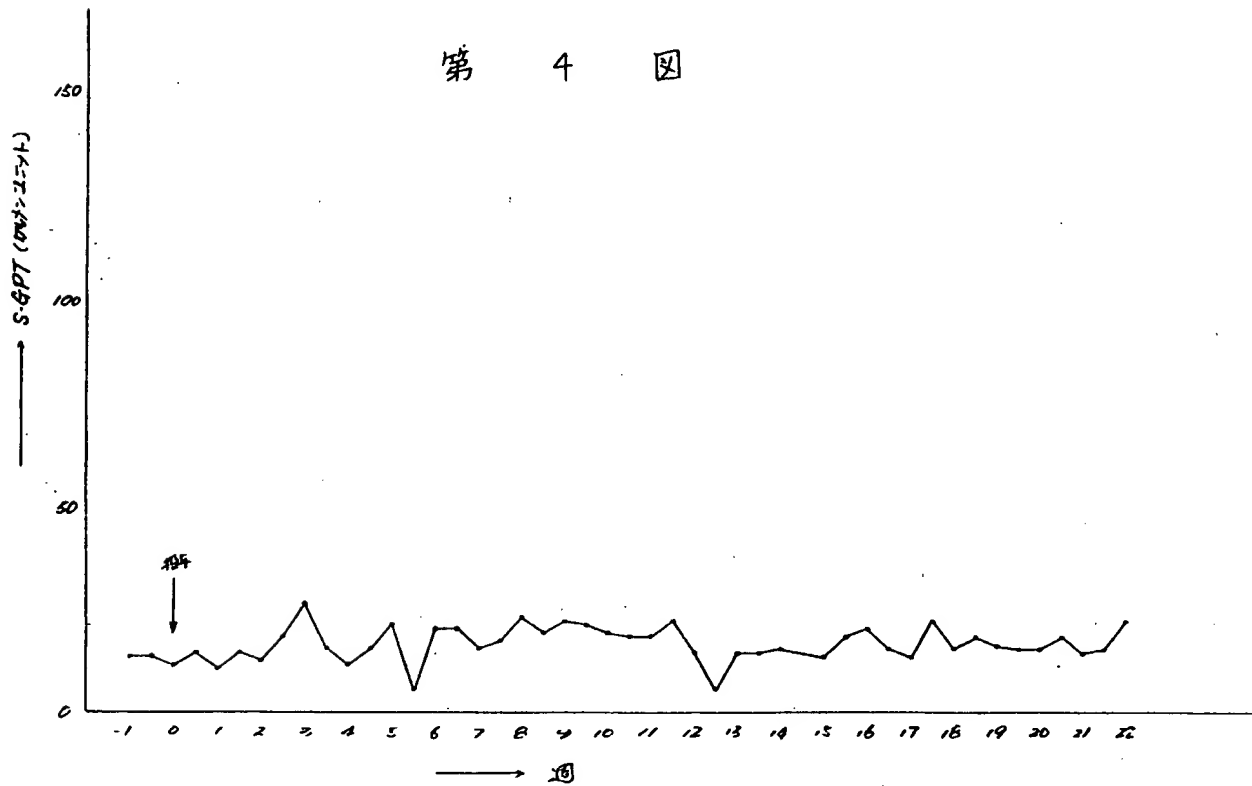
第 2 図



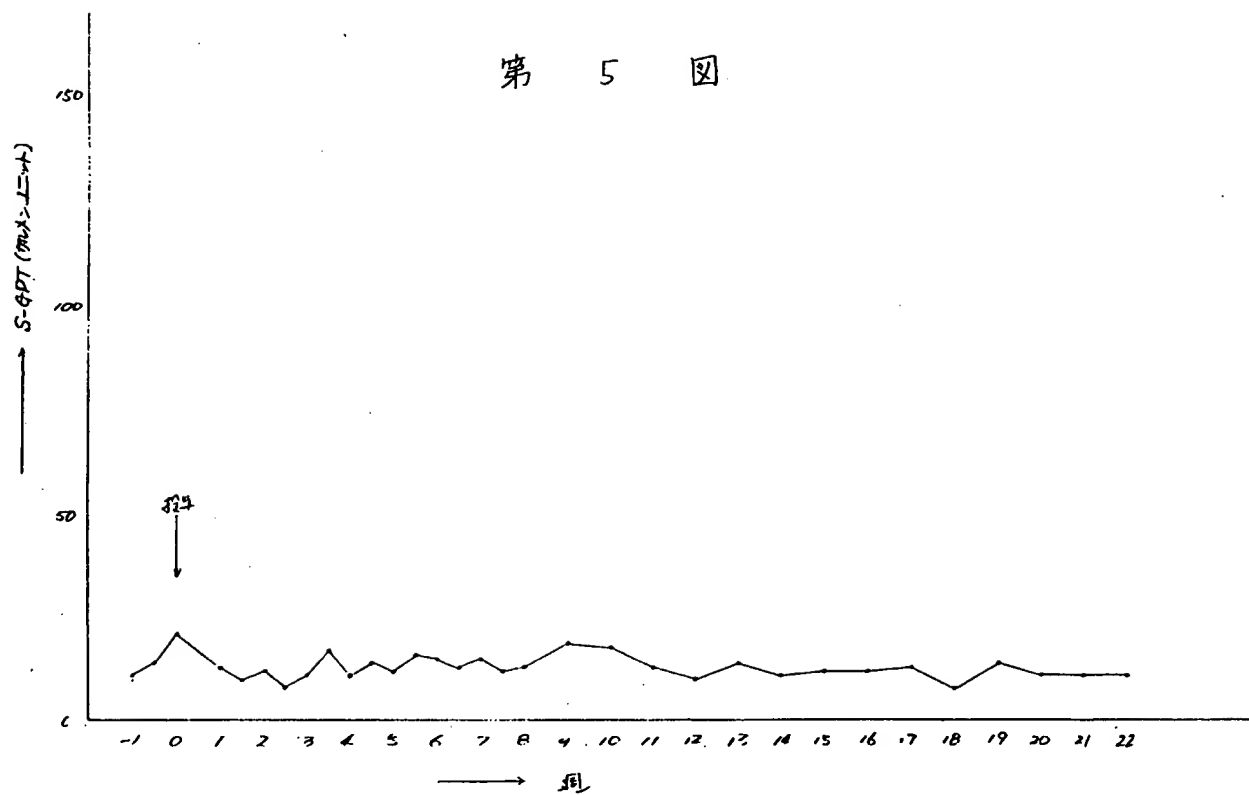
第 3 図



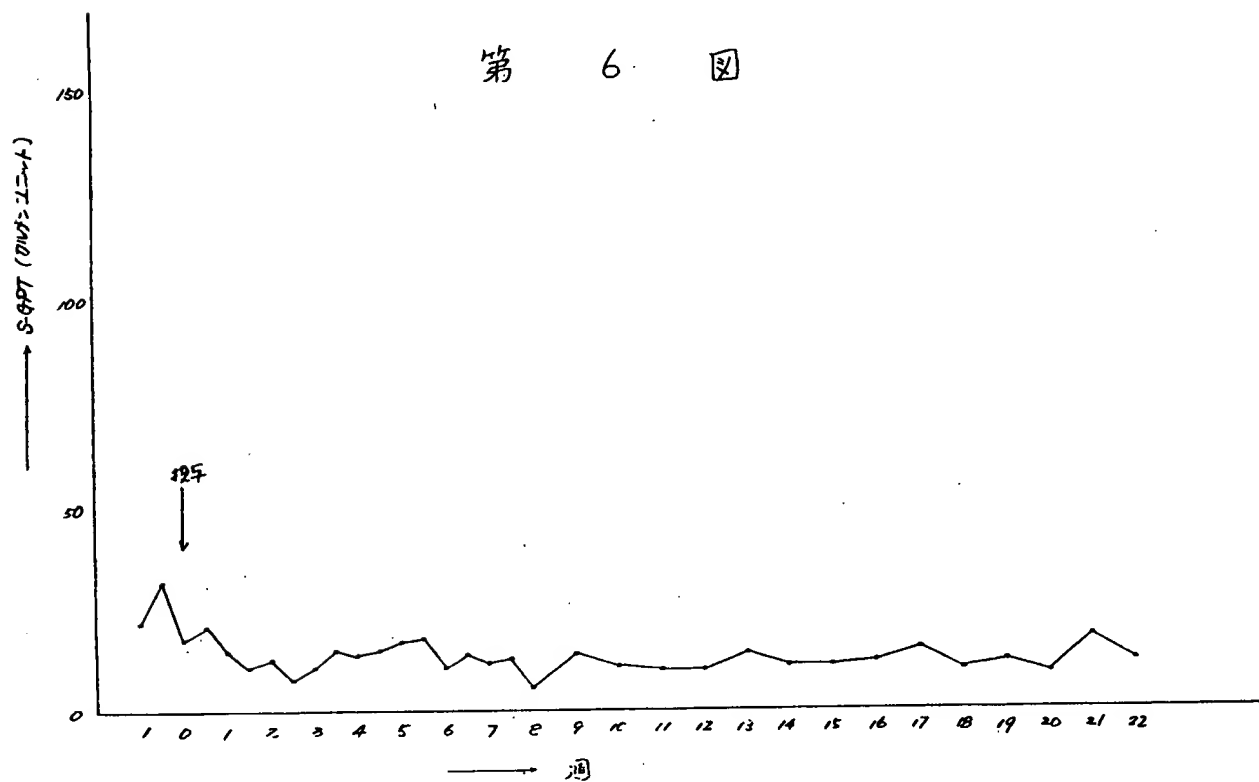
第 4 図



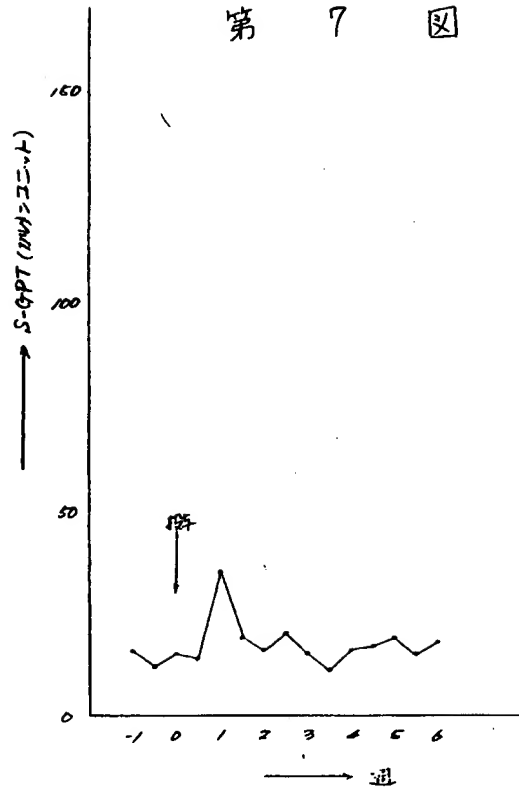
第 5 図



第 6 図



第 7 図



第 8 図

